

# Продукция цитокинов клетками-эффекторами системы естественной цитотоксичности мышей при развитии карциномы легких Льюис

*Шерстобоев Е.Ю., Капля О.А., Зуева Е.П., Разина Т.Г., Эпштейн О.И.*

## Production of cytokines by cell-effectors of natural cytotoxicity system in mice under development of Lewis lung carcinoma

*Sherstoboyev Ye.Yu., Kaplya O.A., Zuyeva Ye.P., Razina T.G., Epstein O.I.*

НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск

ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг»», г. Москва

© Шерстобоев Е.Ю., Капля О.А., Зуева Е.П. и др.

Исследовали продукцию цитокинов клетками-эффекторами системы естественной цитотоксичности при развитии карциномы легких Льюис у мышей линии F<sub>1</sub> (СВАхС57В1/6). Было показано, что при изучаемой экспериментальной модели злокачественного роста наблюдалось повышение выработки интерлейкина-1 $\beta$  (ИЛ-1 $\beta$ ) и фактора некроза опухоли- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) перитонеальными макрофагами, при этом баланс цитокинов, продуцируемых Т-хелперами (Th), смещался в сторону Th2, выработка ИЛ-4 усиливалась, а продукция интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ) и ИЛ-2 была снижена. Повышение продукции ИЛ-10 лимфоцитами наблюдалось в поздние сроки развития опухоли.

**Ключевые слова:** цитокины, карцинома легких Льюис, лимфоциты, перитонеальные макрофаги.

Cytokine production by cell-effectors of natural cytotoxicity system under Lewis lung carcinoma development in F<sub>1</sub>(CBAxС57В1/6) line mice has been studied. It has been revealed the increase of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) by peritoneal macrophages. At this the balance of cytokines produced by T-helpers (Th) has been displaced to Th2 side, IL-4 production has increased and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and IL-2 production has decreased. The rise of IL-10 production by lymphocytes has been observed in the later terms of tumor development.

**Key words:** cytokines, Lewis lung carcinoma, lymphocytes, peritoneal macrophages.

УДК 577.175.14:616.24-006.6

## Введение

В последние годы в иммунологии активно изучается и находит все большее применение новый класс пептидов иммунной природы, обозначаемых как цитокины [6]. Эти факторы участвуют в развитии иммунных реакций по клеточному или гуморальному типу, в трансплантационном иммунитете, в индукции толерантности и во многих других жизненно важных процессах организма [6, 9, 14]. Доказана ключевая роль цитокинов в осуществлении противоопухолевой защиты

организма [9, 11—13, 16, 17]. В частности, цитокины называют эндогенными иммуномодуляторами [1, 5] из-за их способности усиливать активность цитотоксических лимфоцитов, естественных киллеров и макрофагов. Неиммунологические механизмы противоопухолевых и противометастатических эффектов цитокинов связаны с их ролью как негативных факторов роста [1]. Кроме того, некоторые цитокины, в частности фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), оказывают прямое цитотоксическое действие на

опухолевые клетки [2]. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение выработки ключевых цитокинов клетками-эффекторами системы естественной цитотоксичности мышей при развитии карциномы легких Льюис.

## Материал и методы

Исследования были проведены на 96 мышам-самцах линии  $F_1$  (СВАхС57В1/6) в возрасте 2—2,5 мес, массой 18—20 г, полученных из лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН. В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована карцинома легких Льюис (LLC), которую перевивали в мышцу задней лапы взвесью клеток в количестве  $5\text{--}6 \cdot 10^6$  на 1 животное. В качестве контроля использовали intactных мышей ( $n = 6$ ) соответствующего пола и возраста.

Проводилось изучение уровней цитокинов ФНО- $\alpha$ , интерлейкина- $1\beta$  (ИЛ- $1\beta$ ) в супернатантах перитонеальных макрофагов экспериментальных животных, а также интерферона- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10 в культуральных жидкостях лимфоцитов. Клетки перитонеального экссудата мышей выделяли путем промывания брюшной полости мышей 5 мл среды 199 (ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск), содержащей 10 ЕД гепарина, 40 мкг/мл гентамицина и 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («BioClot», Германия) [4]. Затем отмытые и осажденные центрифугированием клетки ресуспендировали в полной культуральной среде с 5%-й ЭТС и вносили их в количестве  $1 \cdot 10^7$  в пластиковые (90 мм) чашки Петри. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С и 5%-м  $\text{CO}_2$  среду с неприлипшими клетками удаляли из чашек, а прилипшие клетки соскабливали с поверхности чашек Петри силиконовым скребком. Количество жизнеспособных макрофагов опытных и контрольной групп довели до концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл и инкубировали в полной культуральной среде следующего состава: 90% среды RPMI-1640 (ГНЦ ВБ «Вектор», г. Новосибирск), 10% ЭТС («BioClot», Германия), предварительно инактивированной теплом (56 °С, 30 мин), 2 ммоль L-глутамин («Sigma», США), 10

мм HEPES («Flow», Великобритания), 40 мг/л гентамицина («Serva», ФРГ), 25 мкмоль 2-меркаптоэтанола («Sigma», США) в течение суток при 37 °С, 5%-й  $\text{CO}_2$  и 100%-й влажности воздуха при добавлении липополисахарида (ЛПС) *Escherichia coli* Serotype 055:B5 («Sigma», США) 10 мкг/мл.

Лимфоциты выделяли из взвеси селезеночных клеток мышей на градиенте фиколла-пака (плотность 1,077 г/см<sup>3</sup>) [4]. Лимфоциты дважды отмывали средой 199 с 5%-й ЭТС. Количество жизнеспособных лимфоцитов опытных и контрольной групп довели до концентрации  $2 \cdot 10^6$  клеток/мл и инкубировали в полной культуральной среде в течение суток при 37 °С, 5%  $\text{CO}_2$  и 100%-й влажности воздуха при добавлении конканавалина А (Кон А) («ICN», США) 5 мкг/мл. По окончании инкубации в обоих случаях собирали кондиционные среды и хранили не более месяца при –50 °С.

ФНО- $\alpha$ , ИЛ- $1\beta$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-10 в культуральных супернатантах тестировали на 13, 15, 17, 19 и 22-е сут после трансплантации опухоли иммуноферментным методом с использованием наборов фирмы «Amersham Pharmacia Biotech» (Великобритания) согласно методическим указаниям, прилагаемым к наборам, и анализатора иммуноферментных реакций «Униплан» АИФР-01, производства ЗАО «Пикон» (г. Москва).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ Statistica for Windows (версия 5.0) с использованием непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни.

## Результаты и обсуждение

При изучении динамики продукции ИЛ- $1\beta$  перитонеальными макрофагами у мышей с карциномой легких Льюис наблюдалось повышение исследуемого показателя по сравнению с intactными животными с 13-х по 19-е сут эксперимента, причем максимальное значение было отмечено на 13-е сут опыта и составило  $418,50 \pm 35,44$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), а минимальное значение — на 17-е сут исследования —

$126,23 \pm 2,72$  пг/мл ( $p < 0,001$ ) при контрольных значениях —  $47,86 \pm 4,21$  пг/мл. На 22-е сут после трансплантации опухоли отмечалось уменьшение выработки ИЛ-1 $\beta$  перитонеальными макрофагами мышей-опухоленосителей: уровень ИЛ-1 $\beta$  в культуральных супернатантах достигал  $23,69 \pm 1,28$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), при  $47,86 \pm 4,21$  пг/мл в контрольной группе (рис. 1,а, табл. 1).

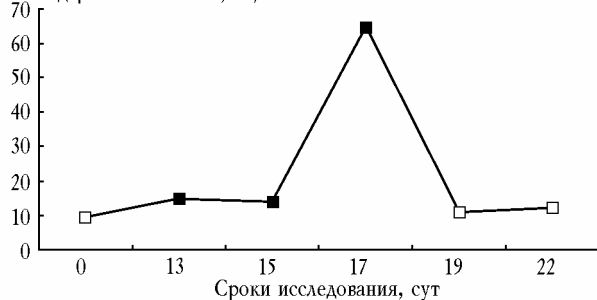
Уровень продукции ФНО- $\alpha$  перитонеальными макрофагами мышей с карциномой легких Льюис на 13, 15 и 17-е сут эксперимента был значительно выше контрольных значений. Так, на 13-е сут опыта уровень продукции ФНО- $\alpha$  превышал значения у интактных мышей на 51% ( $p < 0,01$ ), на 15-е сут исследования — на 43% ( $p < 0,01$ ). Максимальное увеличение данного показателя наблюдалось на 17-е сут исследования, когда уровень выработки ФНО- $\alpha$  перитонеальными макрофагами мышей с опухолью в 6,6 раза ( $p < 0,01$ ) был выше относительно значений интактных животных. В дальнейшем (на 19-е и 22-е сут) уровень ФНО- $\alpha$  в супернатантах, полученных от перитонеальных макрофагов животных-опухоленосителей, приближался к значениям интактных мышей (рис. 1,б, табл. 1).

Содержание ИЛ-1 $\beta$ , пг/мл



а

Содержание ФНО- $\alpha$ , пг/мл



б

# Продукция цитокинов клетками-эффекторами...

Рис. 1. Динамика продукции ИЛ-1 $\beta$  (а) и ФНО- $\alpha$  (б) перитонеальными макрофагами мышей с карциномой легких Льюис. Темным квадратом обозначены достоверные различия по сравнению с контролем

Таблица 1

Количество ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  в культуральных супернатантах перитонеальных макрофагов, пг/мл

Сроки исследования, сут	ИЛ-1 $\beta$	ФНО- $\alpha$
Контроль	47,86	9,76
13	418,50	14,79
15	352,18	13,97
17	126,23	64,86
19	336,65	10,85
22	23,69	12,14

Цитокинам ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  присуща противоопухолевая активность, которая может реализоваться в различных механизмах [2, 10]. Однако в процессе роста опухоли, когда нарушены регуляторные взаимоотношения между разнообразными гомеостатическими системами организма, как снижение, так и возрастание продукции ИЛ-1 и ФНО- $\alpha$  одинаково неблагоприятны для организма-опухоленосителя, так как и в том, и в другом случае создаются условия для дальнейшего роста опухоли и ее диссеминации [7]. Кроме того, по мнению ряда авторов [8], при росте опухоли активированные макрофаги переключаются с цитотоксической активности в отношении злокачественных клеток на фидерную (продукция стимулирующих рост опухоли факторов).

Во все сроки наблюдения (13—22-е сут) уровень продукции ИФН- $\gamma$  лимфоцитами животных с карциномой легких Льюис был снижен по сравнению со значениями у интактных мышей. Минимальное количество ИФН- $\gamma$  в супернатантах лимфоцитов было зарегистрировано на 15-е сут исследования и составило  $3142,40 \pm 235,60$  пг/мл при  $3573,45 \pm 8,33$  пг/мл в контрольной группе (рис. 2,а, табл. 2).

## Экспериментальные и клинические исследования

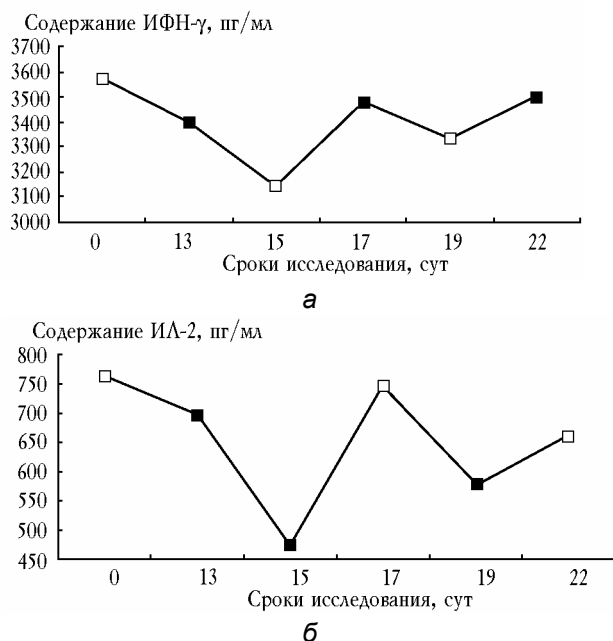


Рис. 2. Динамика продукции ИФН-γ (а) и ИЛ-2 (б) лимфоцитами мышей с карциномой легких Льюис. Темным квадратом обозначены достоверные различия по сравнению с контролем

Таблица 2  
Количество ИФН-γ и ИЛ-2 в культуральных супернатантах лимфоцитов, пг/мл

Сроки исследования, сут	ИФН-γ	ИЛ-2
Контроль	3573,45	763,14
13	3398,42	696,47
15	3142,40	474,17
17	3477,05	747,45
19	3334,68	577,51
22	3499,14	661,62

При исследовании динамики продукции ИЛ-2 лимфоцитами мышей с карциномой легких Льюис было обнаружено, что содержание данного цитокина в супернатантах лимфоцитов было достоверно ниже, чем в контрольной группе на протяжении всего периода наблюдения. Минимальное количество ИЛ-2 в изучаемых образцах было зарегистрировано на 15-е сут исследования и составило  $474,13 \pm 31,91$  пг/мл ( $p < 0,001$ ) при  $763,14 \pm 12,55$  пг/мл у интактных животных, а максимальное — на 17-е сут опыта —  $747,45 \pm 3,87$  пг/мл, хотя оно и не достигало уровня фона (рис. 2,б, табл. 2).

Проведенные исследования показали, что продукция ИЛ-4 лимфоцитами мышей с карциномой легких Льюис увеличивалась с 13-х по 19-е сут исследования с  $136,65 \pm 10,06$  пг/мл до  $204,36 \pm 14,20$  пг/мл ( $p < 0,001$ ), при контрольном значении  $50,62 \pm 2,10$  пг/мл. В терминальную стадию опухолевого процесса (22-е сут) наблюдалось снижение уровня ИЛ-4 в супернатантах лимфоцитов, однако при этом содержание ИЛ-4 в исследуемых образцах было в 2,4 раза ( $p < 0,001$ ) выше, чем у интактных животных (рис. 3,а, табл. 3).

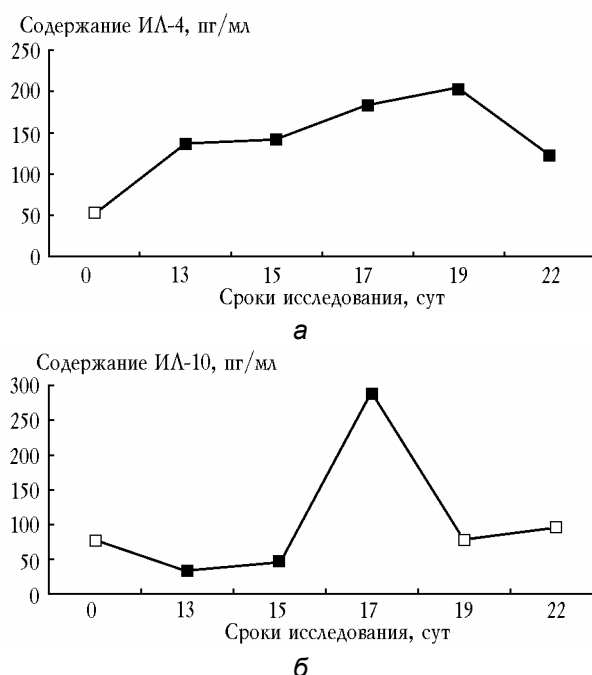


Рис. 3. Динамика продукции ИЛ-4 (а) и ИЛ-10 (б) лимфоцитами мышей с карциномой легких Льюис. Темным квадратом обозначены достоверные различия по сравнению с контролем

Таблица 3  
Количество ИЛ-4 и ИЛ-10 в культуральных супернатантах лимфоцитов, пг/мл

Сроки исследования, сут	ИЛ-4	ИЛ-10
Контроль	50,62	76,86
13	136,65	32,94
15	141,70	45,07
17	183,54	289,80
19	204,36	77,14
22	121,46	95,99

При изучении динамики продукции ИЛ-10 лимфоцитами мышей с карциномой легких Льюис было выявлено снижение данного показателя на 13-е и

15-е сут исследования, которое сменялось в дальнейшем (на 17-е и 22-е сут) подъемом уровня ИЛ-10 в культуральных супернатантах лимфоцитов. Минимальное значение продукции ИЛ-10 было зарегистрировано на 13-е сут после трансплантации опухоли и составило  $32,94 \pm 2,42$  пг/мл, ( $p < 0,001$ ) при уровне контрольной группы —  $76,86 \pm 7,29$  пг/мл, а максимальное — на 17-е сут —  $289,80 \pm 26,12$  пг/мл ( $p < 0,001$ ) (рис. 3,б, табл. 3).

Наблюдаемый нами сдвиг в выработке цитокинов, возможно, был опосредован трансформирующим фактором роста  $\beta$  (ТФР- $\beta$ ), который продуцировали опухолевые клетки. Так, в работе Н. Maeda, A. Shiraishia (1996) было показано, что клетки лимфомы EL-4 способны продуцировать ТФР- $\beta$  как *in vitro*, так *in vivo* [15]. Кроме того, вырабатываемый клетками опухоли ТФР- $\beta$  индуцировал выработку ИЛ-10, а продукция ИЛ-2 и ИФН- $\gamma$  снижалась по мере роста опухоли. Вмешательство опухолевых клеток в процесс созревания и селекции Т-лимфоцитов может являться одним из факторов опухолевой прогрессии [3].

## Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований было установлено, что при росте карциномы легких Льюис наблюдалось значительное повышение продукции ИЛ-1 $\beta$  и ФНО- $\alpha$  перитонеальными макрофагами по сравнению с интактными животными. Так, было выявлено повышение содержания в культуральных супернатантах ИЛ-1 $\beta$  с 13-х по 19-е сут и ФНО- $\alpha$  на 13—17-е сут после трансплантации опухоли. При изучении динамики продукции гуморальных факторов лимфоцитами при данной экспериментальной модели злокачественного роста было выявлено смещение баланса цитокинов, вырабатываемых Т-хелперами, в сторону Th2. Так, выработка ИЛ-4 усиливалась по сравнению с интактной группой животных, а продукция ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 была снижена на протяжении всего периода исследования. Следует отметить, что при развитии карциномы легких Льюис у мышей наблюдалась волнообразная динамика продукции ИЛ-10 лимфоцитами: снижение исследуемого показателя на 13—15-е сут эксперимента сменя-

лось значительным повышением выработки данного цитокина (17-е сут) по сравнению с интактными животными.

## Литература

1. Акимов М.А., Гершанович М.Л. Модификаторы биологических реакций в лечении диссеминированной меланомы // *Вопр. онкол.* 2002. Т. 48. < 2. С. 172—176.
2. Зубова С.Г., Окулов В.Б. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей  $\alpha$  и трансформирующего фактора роста  $\beta$  в процессе ответа макрофага на активацию // *Иммунология.* 2001. < 5. С. 18—22.
3. Головозний М.В. Вмешательство раковых клеток в процессы созревания и селекции Т-лимфоцитов как фактор опухолевой прогрессии // *Иммунология.* 2001. < 6. С. 4—10.
4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. Томск: Изд-во ТГУ, 1992. 272 с.
5. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., Воробьев А.А. Эндогенные иммуномодуляторы. СПб.: Гиппократ, 1992. 256 с.
6. Ковальчук Л.В. Новый класс биологически активных пептидов-иммуоцитокинов в клинической практике // *Рос. мед. журн.* 1997. < 1. С. 59—61.
7. Навашин С.М., Вядро М.М. Модификаторы биологических реакций в терапии злокачественных новообразований // *Итоги науки и техники. Сер. Онкология.* 1989. Т. 21. С. 186.
8. Окулов В.Б., Войтенко Б.О. Роль макрофагов в опухолевом росте // *Вопр. онкол.* 1990. Т. 36. < 10 С. 1172—1177.
9. Павлова К.С., Шпакова А.П., Дронова В.М. и др. Иммуномодулирующее действие естественного комплекса цитокинов на пролиферацию лимфоцитов и активность естественных киллеров человека *in vitro* // *Иммунология.* 2000. < 2. С. 32—36.
10. Суслов А.П. Макрофаги и противоопухолевый иммунитет // *Итоги науки и техники. Сер. Онкология.* 1990. Т. 19. 168 с.
11. Фрейдлин И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // *Иммунология.* 2001. < 5. С. 4—7.
12. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии // *Иммунология.* 1998. < 2. С. 9—12.
13. Ishihara Y., Iijima H., Matsunaga K. Contribution of cytokines on the suppression of lung metastasis // *Biotherapy.* 1998. V. 11. < 4. P. 267—275.
14. Langhans W., Hrupka B. Interleukins and tumor necrosis factor as inhibitors of food intake // *Neuropeptides.* 1999. V. 33. < 5. P. 415—424.
15. Maeda H., Shiraishia A. TGF- $\beta$  contributes to the shift toward Th-2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice // *Immunol.* 1996. V. 156. P. 73—78.
16. Punnonen R., Teisala K., Kuoppala T. et al. Cytokine

#### **Экспериментальные и клинические исследования**

- production profiles in the peritoneal fluids of patients with malignant or benign gynecologic tumors // *Cancer*. 1998. V. 83. № 4. P. 788—796.
17. *Takeuchi T., Ueki T., Sasaki Y.* et al. Th-2-like re-

sponse and antitumor effect of antiinterleukin-4 mAb in mice bearing renal cell carcinoma // *Cancer Immunol. Immunother.* 1997. V. 43. № 6. P. 375—381.

Поступила в редакцию 25.03.2004 г.